

УДК 532.22

Научная аппаратура, предназначенная для реализации метода температурно-управляемой криSTALLизации белков в условиях микрогравитации

Б.В. Чернышев, И.Н. Дутышев¹, Н.В. Загряжский, А.А. Павлов,

В.И. Стрелов², Б.Г. Захаров³, И.Ж. Безбах⁴

¹к.т.н., ²д.ф.-м.н., ³д.т.н., ⁴к.ф.-м.н.

ФГУП СКБ ИРЭ РАН

e-mail: din@sdbireras.ru, boriskvant2012@mail.ru

Аннотация. Разработанный летный образец научной аппаратуры практически, в условиях наземной отработки и космического эксперимента, реализует метод

температурно-управляемой кристаллизации белков. Этот метод за счет использования рентгеновских капилляров не требует большого количества растворов белка, исключает возможность повреждения кристаллов при проведении дифракционных исследований. Был успешно реализован алгоритм автоматического изменения температуры, позволяющий по определенному закону приближаться к требуемому пересыщению, регулируя количество зародышей и скорость роста кристаллов. По результатам дифракционных экспериментов был сделан вывод, что в условиях космического эксперимента методом температурно-управляемой кристаллизации во всех вариантах ростовых проб удалось получить кристаллы лизоцима, обладающие высоким структурным совершенством.

Ключевые слова: белок, кристалл, рост, зародышеобразование, управление, микрогравитация, эксперимент

Введение

Для решения прикладных задач генной инженерии и структурной биологии, а также для разработки новых лекарственных препаратов ощущается острая необходимость в получении высокосовершенных кристаллов белков. Кристаллы белка необходимы для установления пространственной структуры биомакромолекул методами рентгеноструктурного анализа [1–2]. Поэтому, в настоящее время, кристаллизация белков превратилась в важную самостоятельную область.

Эксперименты по росту кристаллов белков в космосе проводятся в нашей стране с 1987 г. и по настоящее время. Однако, основные методы кристаллизации белков, которые разработаны и используются для выращивания кристаллов (метод диализа, свободной диффузии через поверхность раздела, диффузии паров растворителя), не позволяют оперативно управлять процессом кристаллизации ни на первой, ни на второй стадиях этого процесса. Значительные исходные пересыщения (400–1000) % раствора белка, требуемые для зарождения кристаллов, приводят в дальнейшем к спонтанной кристаллизации и получению, как правило, мозаичных по структуре кристаллов с включениями примесей и других дефектов, обусловленных влиянием вибраций и других внешних воздействий на процессы массопереноса. В связи с этим, актуальной и важной задачей является разработка новых эффективных методов, аппаратуры и технологий получения высококачественных кристаллов биомакромолекул, в том числе в условиях микрогравитации, в которых можно минимизировать влияние внешних воздействий и гравитации [3].

Предлагаемый подход к решению проблемы получения кристаллов с высоким совершенством структуры заключается в реализации метода

температурно-управляемой кристаллизации, обеспечивающего управление процессом роста кристаллов как на этапе их зародышеобразования, так и в процессе кристаллизации.

Данный метод является более технологичным и более эффективным для получения высокосовершенных кристаллов белка по сравнению с традиционными методами. Управление температурой влияет на растворимость белка и скорость роста кристаллов, оставляя концентрацию и объем неизменными. При этом появляется возможность регулировать количество зародышей и скорость роста кристаллов, тем самым процесс кристаллизации становится управляемым и воспроизводимым.

Высокое качество кристаллов, получаемых методом температурно-управляемой кристаллизации, совершенство их структуры, обеспечивает высокое пространственное разрешение деталей структуры макромолекул, что позволяет точнее проследить за процессами и установить механизмы, посредством которых белок осуществляет свою основную функцию – катализатора биохимических процессов в живом организме. Повышение качества и совершенства микроструктуры выращиваемых кристаллов приоритетная задача кристаллографии макромолекул. Качественные и высокосовершенные кристаллы белка позволяют России активно развивать собственную фармацевтическую, медицинскую и биотехнологическую промышленность.

Описание метода температурно-управляемой кристаллизации

Поскольку период нуклеации, скорость зародышеобразования и роста кристаллов, равно как и целый ряд параметров раствора (плотность, коэффициент диффузии, теплопроводность, вязкость и др.) существенно зависят от температуры, то наиболее эффективным и технологичным способом управления процессом кристаллизации белков является использование точно контролируемого теплового воздействия. При этом даже изотермический рост при типичной стабильности поддержания температуры ± 1 °С недостаточен для поддержания действительно стабильных условий роста. Необходимым условием успешного проведения экспериментов является контроль температуры с точностью $\pm(0,1\text{--}0,2)$ °С и ее регистрации.

В земных условиях метод температурно-управляемой кристаллизации обеспечивает приближение к диффузионному массопереносу [4–5], а в условиях невесомости – чисто диффузионный механизм массопереноса при исключении конвекций любого вида с прецизионной $\pm(0,1\text{--}0,2)$ °С локальной стабилизацией температуры и управлением ею в ходе процесса кристаллизации, обеспечивает условия самоорганизации молекул белка

при встраивании их в кристаллическую решетку и позволяет реализовать высокое совершенство выращиваемых кристаллов. При этом в невесомости появляется возможность оптимизировать массоперенос, обусловленный возникновением концентрационной неоднородности вокруг растущего кристалла. Отсутствие конвекции в процессе кристаллизации позволяет также минимизировать влияние вибраций на процессы кристаллизации [4].

Использование тонких рентгеновских капилляров позволяет резко уменьшить степень конвекции в объеме раствора. Тонкие рентгеновские капилляры внутренним диаметром от 0,1 до 1,0 мм изготавливаются, как правило, из стекла, которое обладает достаточной прочностью, прозрачностью в оптическом и рентгеновском диапазоне, позволяет работать с замороженными растворами при температурах до -100°C при использовании синхротронного излучения.

Управление процессом кристаллизации осуществляется путем:

- задания и прецизионного поддержания требуемой температуры всего раствора белка в капилляре;
- поддержания с точностью $\pm(0,1\text{--}0,2)$ $^{\circ}\text{C}$ в локальной точке капилляра с раствором соответствующей температуры для обеспечения необходимого пересыщения для зарождения единичных (1–2) центров кристаллизации;
- изменения температуры в локальной точке капилляра и, соответственно, пересыщения в процессе разращивания кристалла из образовавшегося зародыша.

Схематически данный метод представлен на рис. 1. Капилляр с раствором белка помещается в термостатируемый объем, в котором посредством термоэлектрических модулей устанавливается требуемая для роста кристаллов температура T_2 , которую можно задать в представляющем интерес диапазоне $20\text{--}40$ $^{\circ}\text{C}$. Одновременно локально в одной точке капилляра посредством отдельного термоэлектрического модуля устанавливается другое значение температуры T_1 , благоприятное для образования зародышей. При этом температура T_1 может быть задана как ниже T_2 для белков типа лизоцима с нормальной зависимостью растворимости от температуры, так и выше T_2 при кристаллизации белков типа альбумина с ретроградной, т.е. понижающейся с повышением температуры растворимостью. После образования одного или нескольких зародышей во всем объеме капилляра устанавливается или одна и та же температура T_2 , которая остается неизменной в течение всего последующего процесса роста или могут плавно меняться по определенной программе как T_1 , так и T_2 для компенсации истощения раствора по мере роста кри-

сталла. Применение такой методики позволяет разделить процессы зародышеобразования и дальнейшего роста кристалла путем изменения степени пересыщения, которая для этих двух стадий может отличаться в 5–10 раз.

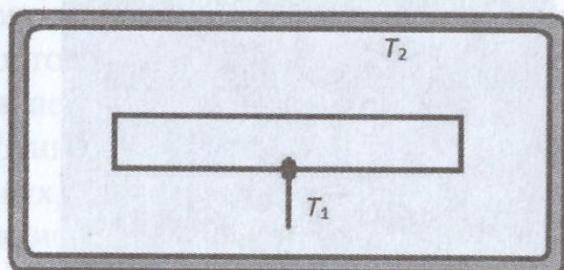


Рис. 1. Схематическое изображение термостатируемой камеры с капилляром

Циклограмма эксперимента включает в себя несколько фаз:

1. выход на рабочий режим при температуре T_1 в точке и температуре T_2 во всем растворе;
2. выдержку при заданных температурах до появления первых зародышей;
3. регулируемое управление температурой в точке и всего объема раствора до роста кристалла размером $\sim(0,5\text{--}1,0)$ мм.

Описание и принцип работы научной аппаратуры

ФГУП СКБ ИРЭ РАН совместно с ИК РАН была разработана и изготовлена научная аппаратура КРИСТАЛЛ, обеспечивающая рост кристаллов белков в капиллярах с оперативным раздельным управлением процессом роста как на этапе зародышеобразования, так и в процессе дальнейшего роста кристаллов при малом количестве раствора белка, требуемого для процесса кристаллизации.

Научная аппаратура выполнена в виде моноблока, в состав которого входят:

- термостатированная камера;
- кассета с капиллярами белковых растворов;
- термодатчики для измерения локальной (в зоне кристаллизации белков) температуры;
- термодатчик для измерения температуры в камере термостата;
- термоэлектрические модули для задания и поддержания температуры непосредственно в точке кристаллизации;
- термоэлектрические модули для задания и поддержания температуры в термостатированной камере;

– система управления для приема команд, управления термоэлектрическими модулями и выдачи телеметрической информации;

Внешний вид научной аппаратуры КРИСТАЛЛ представлен на рис. 2.

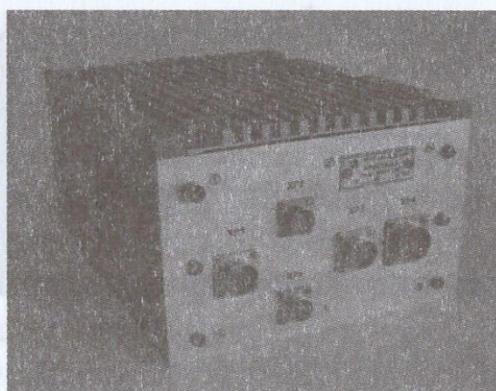


Рис. 2. Внешний вид научной аппаратуры КРИСТАЛЛ

В таблице представлены основные массогабаритные параметры и энергетические характеристики данной научной аппаратуры.

Таблица. Основные массогабаритные параметры и энергетические характеристики научной аппаратуры КРИСТАЛЛ

Наименование	Значение
Масса аппаратуры, кг	$5,0 \pm 0,5$
Габаритные размеры аппаратуры, мм	250x180x120
Количество капилляров	6
Объем капилляра, мкл	10–15
Напряжение питания постоянным током, В	23...32
Энергопотребление в установившемся режиме, Вт	≤ 40 Вт

В качестве материала пассивной теплоизоляции термостатируемой камеры используются пористые материалы (пенопласты) на основе полиуретана и полистирола, которые имеют малый удельный вес ($20 \text{ кг}/\text{м}^3$), обладают малой теплопроводностью ($0,04 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{C})$) и хорошо демпфируют вибрационные и ударные воздействия при запуске и посадке космических аппаратов.

Для проведения экспериментов используются тонкие рентгеновские капилляры внутренним диаметром от 0,1 до 1,0 мм, изготавливаемые, как правило, из стекла, которое обладает достаточной прочностью и прозрачностью в оптическом и рентгеновском диапазоне.

Конструкция научной аппаратуры обеспечивает удобный доступ, монтаж и демонтаж на всех стадиях наземной отработки и послеполетного обслуживания.

Научная аппаратура обеспечивает полностью автоматическое проведение эксперимента на борту космического аппарата «Фотон-М № 4». Запуск процесса кристаллизации производится путем передачи управляющих команд из бортового компьютера космического аппарата в электронную систему управления научной аппаратурой.

В процессе функционирования научной аппаратуры происходит установление требуемых температур на капиллярах, а именно:

- в точках кристаллизации устанавливается более низкая температура, чем температура капилляров, данный процесс соответствует зародышеобразованию и кристаллизации;
- после завершения процесса кристаллизации, температура в точках кристаллизации и температура капилляров выравниваются, данный процесс соответствует прекращению кристаллизации.

Управляющими и измеряемыми параметрами являются две температуры: точки кристаллизации и терmostатируемого объема.

Приготовление раствора и зарядка в капилляры осуществляются при комнатной температуре 18–25 °С.

Описание космического эксперимента

После выхода на орбиту и отсчета времени в 6, 12, 24 ч для разных капилляров осуществляется растворение возможно образовавшихся кристаллитов с проверкой работоспособности аппаратуры: температура в терmostатируемом объеме устанавливается +35 °С. Производится сброс информации на землю о факте выхода на режим, установившиеся значения температур.

Через установленное на земле время (около 24 ч) осуществляется выход на режим зародышеобразования: снижение температуры до значения 32 °С в объеме и в точке отвода тепла до различных значений для разных наборов капилляров. Производится сброс информации на землю о факте выхода на этот режим, установившиеся значения температур.

Далее температура в объеме поддерживается постоянной 32 °С, а в точке отвода тепла снижается до +7 °С с допустимой для научной аппаратуры скоростью – данный процесс соответствует началу роста кристаллов. Производится сброс информации на землю о факте выхода на этот режим, установившиеся значения температур.

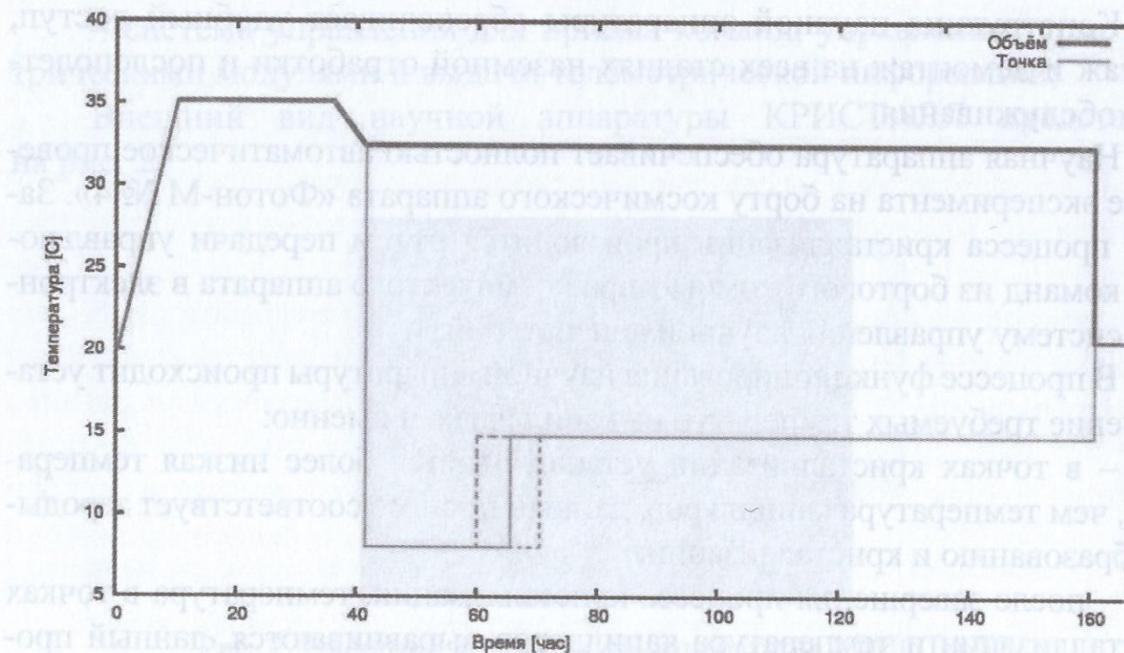


Рис. 3. Разработанная циклограмма космического эксперимента

По истечении 24 ч после запуска роста ожидается образование первых зародышей кристаллов. Температура в точках кристаллизации повышается с +7 °С до +15 °С. Далее осуществляется рост в течение 5 суток. В расчетное время, по окончанию процесса роста кристаллов, температуры в точке и в объеме устанавливаются равными 20 °С, что необходимо для предотвращения дальнейшего зародышеобразования и роста в объеме раствора белка.

Далее представлены полученные в ходе космического эксперимента телеметрические данные изменения температур. До начала эксперимента управления температурой не проводилось, при этом температура находилась в приемлемом для сохранения кристаллизационных проб диапазоне 20–25 °С. Отсутствующий фрагмент соответствует неподконтрольному полету.

Перед началом роста возможный осадок был растворен при температуре 35 °С. Затем были параллельно проведены две серии по три ростовых эксперимента с разными температурными режимами в точке кристаллизации при общей температуре основного объема. В первой серии (А) зародышеобразование проводилось при 7 °С, а основной рост при 10 °С. Во второй серии (В) эти температуры составляли 10 °С и 13 °С. Кроме того, в серии В время зародышеобразования было увеличено с 36 до 48 ч. Таким образом, в общем было проведено шесть кристаллизационных экспериментов.

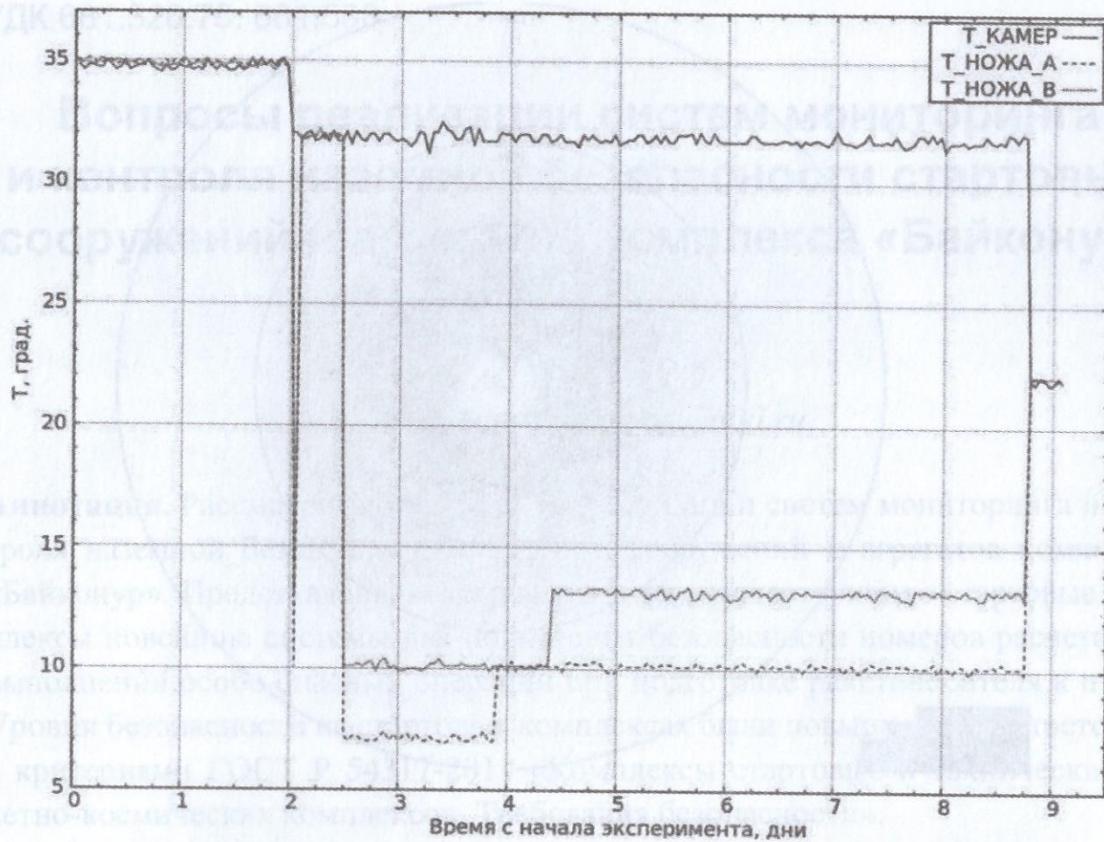


Рис. 4. Изменение температур в процессе проведения космического эксперимента

Результаты космического эксперимента

В результате космического эксперимента были получены кристаллы лизоцима (рис. 5) с высоким совершенством структуры (рис. 6).



Рис. 5. Кристалл лизоцима, полученный в результате космического эксперимента

Заключение

В разработанной научной аппаратуре успешно реализован алгоритм автоматического изменения температуры, позволяющий по определенному закону приближаться к требуемому пересыщению, регулируя процесс зародышеобразования и рост образовавшихся кристаллов.

На примере выращивания в условиях микрогравитации высокосовершенных кристаллов белка лизоцима проведены успешные испытания (июль–сентябрь 2014 г.) научной аппаратуры КРИСТАЛЛ на космическом аппарате «Фотон-М № 4».

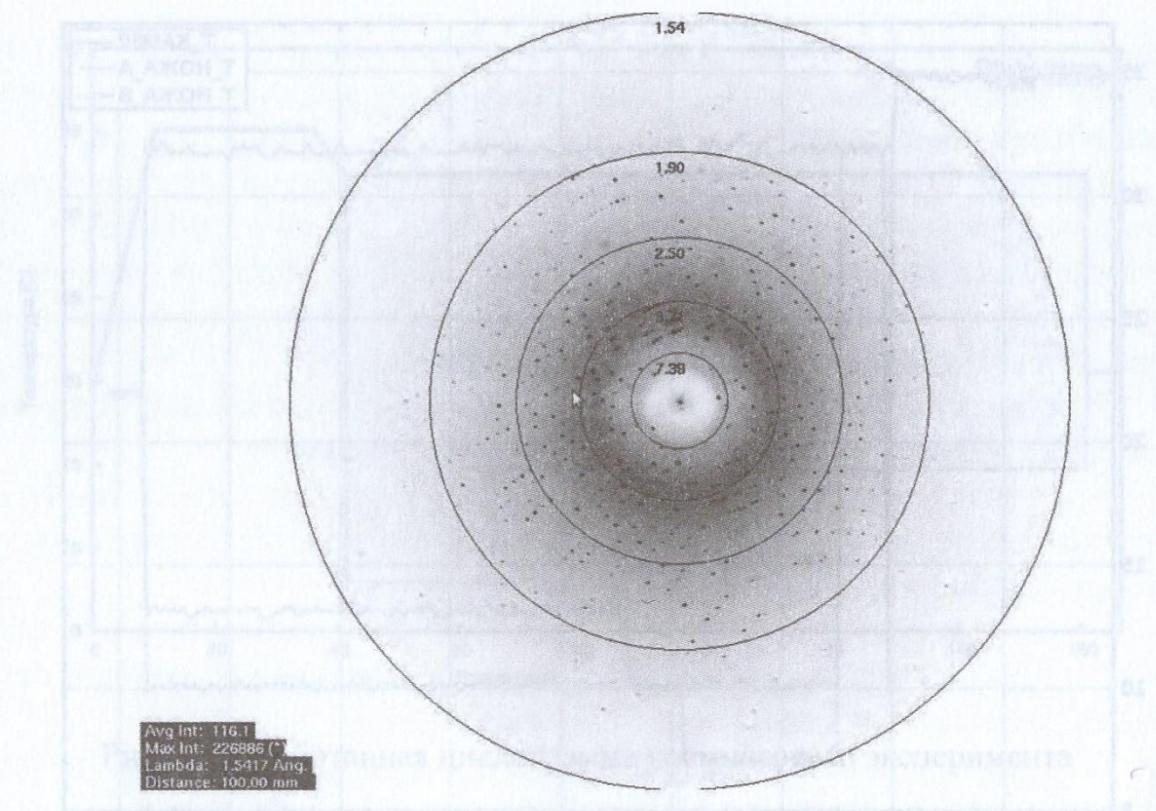


Рис. 6. Рентгенодифракционная картина для кристалла лизоцима, полученного в результате космического эксперимента

Высокий уровень совершенства полученных кристаллов, все они характеризуются уровнем дифракционного разрешения не хуже 1,54 Å, свидетельствует о перспективности использования температурно-управляемого метода направленной кристаллизации, реализованного в данной научной аппаратуре.

Список литературы

1. Chayen N.E. Turning protein crystallisation from an art into a science // Current Opinion in Structural Biology. 2004. Vol. 14. P. 577–583.
2. McPherson A. Protein crystallization in the structural genomics era // Journal of Structural and Functional Genomics. 2004. Vol. 5. P. 3–12.
3. Chayen N.E. Tackling the bottleneck of protein crystallization in the post-genomic era // Trends in Biotechnology. 2002. Vol. 20. P. 98–104.
4. Стрелов В.И., Захаров Б.Г., Безбах И.Ж. и др. Кристаллизация белка лизоцима в прецизионно-управляемом градиенте температуры // Кристаллография. 2008. Т. 53, № 1. С.164–167.
5. Galkin O., Vekilov P.G. Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA: 2000. Vol. 97, No. 12. P. 6277–6281.